

基于质谱成像技术对人肝癌及癌旁组织进行原位脂质组分析

IMS-009

摘要： 本文应用成像质谱显微镜 iMScope QT 对人肝癌及癌旁正常组织中的磷脂酰胆碱、磷脂酰甘油、甘油二酯、游离脂肪酸、脂酰肉碱、磷脂酰乙醇胺、磷脂酰肌醇等七类脂质分子进行了组织原位空间分布分析，在癌组织中筛选出一系列相对于癌旁含量变化显著的脂质分子，为肝癌生物标志物的筛选、脂质代谢机制的研究提供了参考。

关键词： 成像质谱显微镜 iMScope QT 肝癌 脂质 空间分布

脂质是一类疏水性生物分子，包括脂肪酸、磷脂、鞘脂、甘油酯、固醇酯、糖脂等，具有多种重要的生物功能，如组成生物膜、参与能量代谢及信号转导、影响细胞增殖、细胞黏附和运动等。脂质与肿瘤的发生、发展、侵袭和转移密切相关，脂代谢异常被认为是肿瘤的特征之一。肝脏是进行脂质代谢调节的重要场所，肝功能受损可能会导致脂质的代谢异常。

肝细胞癌 (hepatocellular carcinoma, HCC) 是世界上最常见的消化道恶性肿瘤之一，严重威胁人类生命健康。对肝癌患者病灶组织进行脂质组分析，有助

于肝癌发病机制研究、疾病诊断、预后判定及靶向治疗。脂质组学常用的研究手段为色谱质谱联用技术，需要对样品进行复杂的前处理，且无法观察到脂质分子在组织内的空间分布情况。本文应用岛津成像质谱显微镜 iMScope QT 对人肝癌及癌旁正常组织进行原位脂质组分析，通过比较癌、癌旁区域内磷脂酰胆碱、磷脂酰甘油、甘油二酯、游离脂肪酸、脂酰肉碱、磷脂酰乙醇胺、磷脂酰肌醇等七类脂质分子含量的变化，筛选到一系列含量变化显著的脂质分子，为肝癌生物标志物筛选、脂质代谢机制研究提供参考。

■ 实验部分

1.1 仪器

成像质谱显微镜 iMScope QT



图 1 岛津成像质谱显微镜 iMScope QT

1.2 仪器参数

分析模式：	正离子模式	激光器：	355 nm YAG 激光器
像素间距：	50 μm *50 μm	激光照射直径：	5 μm
激光能量：	45 (范围 0-100)	激光照射次数：	200 shots
扫描频率：	2000 Hz	扫描范围：	m/z 50-1000
检测器电压：	2.40 kV		

1.3 试剂与样品

基质：DHB（2,5-二羟基苯甲酸）

样品：人肝癌及癌旁正常组织

1.4 样品前处理

样品准备：将人肝癌及癌旁正常组织样品进行冰冻切片，厚度为 10 μm ，粘贴在载玻片上。

基质涂敷：使用 iMLayer 基质升华装置在载玻片表面涂敷 DHB 基质，加热温度设定为 180 $^{\circ}\text{C}$ ，膜厚设定为 1.2 μm 。升华完成后使用手动喷枪在载玻片表面均匀喷涂少量 DHB 基质溶液，将载玻片送入成像质谱显微镜进行分析。



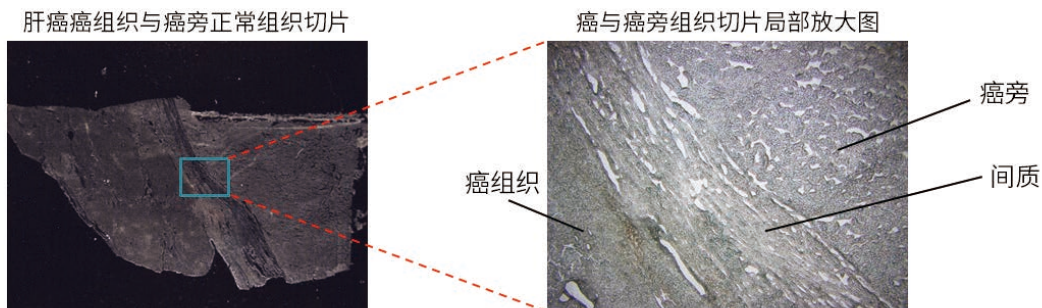
图 2 岛津全自动基质升华装置 iMLayer

■ 结果与讨论

2.1 肝癌组织和癌旁组织切片的光学图像、ROI 设置与 TIC 结果

对人肝癌及癌旁正常组织的切片进行光学显微照片拍摄（图 1），局部放大图显示癌组织、间质、癌旁等区域的细胞形态有明显不同，可通过形态特征将这三个区域进行区分。将切片涂敷 DHB 基质后，使用 iMScope QT 进行质谱采集，设定采样间隔为 50 μm 。考虑到低分子量端基质分子的信号干扰，质谱扫描范围按照 m/z 50-500、 m/z 500-1000 间隔 1/2 pitch（采样间隔）分别进行扫描，每种扫描范围下各采集 83676 个样品点，质谱图见图 4。

采集的质谱数据使用 IMAGEREVEAL MS 软件进行分析，按照癌组织、间质、癌旁三个区域进行 ROI（感兴趣区域）设置（图 2），使用软件自带的脂质数据库进行提取分析，分析质量误差设定为 20 ppm，样品的 TIC（总离子流图）见图 3。由 TIC 图可见，各区域总离子的分布有明显不同，具有区域特征性。



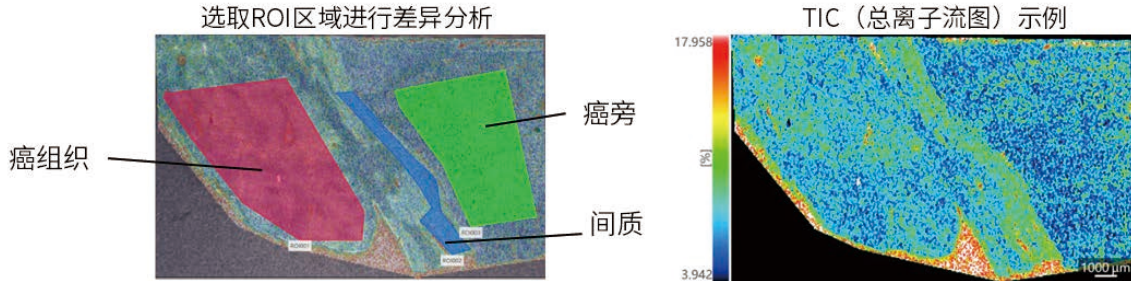


图3 肝癌癌组织和癌旁正常组织切片光学照片、ROI 区域设定以及 TIC 图

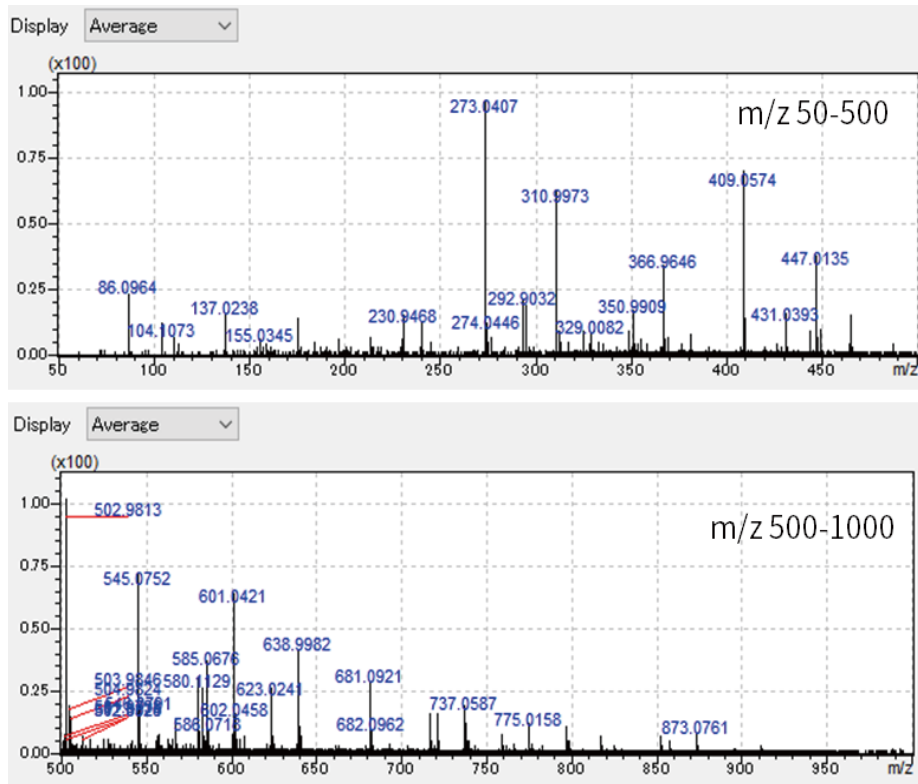


图4 肝癌癌组织和癌旁正常组织切片平均质谱图

2.2 不同区域中脂质整体分布情况

IMAGEREVEAL MS 软件分析结果显示，切片样品癌组织中脂质平均信号强度略高于癌旁，显著高于间质区域（表1）。癌组织、间质及癌旁正常组织区域中各自信号强度较高的前8位脂质成分以及各区域脂质平均信号强度见表1。

在所分析的脂质成分中，磷脂酰胆碱（PC）的含量最为丰富。与癌旁正常组织相比，癌组织中甘油二酯（DG）的变化最为显著，且以上调为主。另一类变化较为显著的脂质成分为游离脂肪酸（FFA）。磷脂酰乙醇胺（PE）与磷脂酰肌醇（PI）变化相对较小。癌组织中变化较为显著的脂质成分分析结果示例见表2。

表 1 癌组织、间质、癌旁中各自信号强度较高的前 8 位脂质成分及各区域脂质平均信号强度

No.	癌组织	间质	癌旁
Rank No.1	PC(34:2)	AC(25:1)	PC(34:2)
Rank No.2	AC(25:3)	PC(32:0)	PC(34:1)
Rank No.3	PG(38:5)	AC(25:3)	PG(38:5)
Rank No.4	PG(36:2)	AC(25:2)	PG(36:2)
Rank No.5	PC(34:1)	PC(34:2)	PE(36:2)
Rank No.6	AC(25:1)	AC(26:6)	PC(36:2)
Rank No.7	PC(36:2)	PC(34:1)	AC(25:3)
Rank No.8	PC(36:5)	PG(38:8)	PG(26:1)
Ave. intensity	728	224	591

表 2 癌组织相对于癌旁变化较显著的脂质成分分析结果示例

Label	m/z	Adduct Ion	癌组织 Intensity	癌旁 Intensity	癌 / 癌旁 Ratio
FFA (18:3)	279.2319	M+H	289.00	25.34	11.41
FFA (16:0)	279.2295	M+Na	261.89	23.36	11.21
DG(34:2)	615.4959	M+Na	1327.44	119.00	11.16
AC (24:1)	454.3891	M+H	50.05	4.99	10.03
DG (38:6)	641.5140	M+H	935.21	98.19	9.52
DG (36:3)	657.4860	M+K	3122.64	332.12	9.40
DG (38:5)	643.5296	M+H	763.25	88.87	8.59
FFA (22:1)	377.2822	M+K	460.63	62.35	7.39
AC (23:2)	438.3578	M+H	63.27	8.82	7.17
DG (36:2)	659.5017	M+K	2809.41	399.08	7.04
FFA (18:1)	283.2632	M+H	121.99	18.32	6.66
DG (34:1)	633.4860	M+K	3053.23	503.24	6.07
AC(30:1)	538.4830	M+H	58.47	9.89	5.91
AC(28:1)	510.4517	M+H	96.60	19.59	4.93
DG (36:4)	617.5140	M+H	989.81	202.45	4.89
DG (36:1)	661.5173	M+K	693.26	143.12	4.84
DG (32:0)	569.5140	M+H	105.94	23.54	4.50
AC(21:1)	412.3421	M+H	54.13	12.03	4.50
DG (38:2)	687.5330	M+K	606.96	149.79	4.05
DG (32:1)	589.4802	M+Na	425.46	106.59	3.99

2.3 各类脂质的空间分布情况

各类脂质的软件分析结果示例见表 3。

磷脂酰胆碱 (PC) 在癌、癌旁区域中的含量均比较丰富, 其中 PC (34:2) 的含量最高。与癌旁区域相比, 癌组织中 PC (44:4)、PC (42:1)、PC (38:5)、PC (36:2)、PC (38:7) 等含量明显上调, PC (32:0)、PC (30:0) 等含量下调。

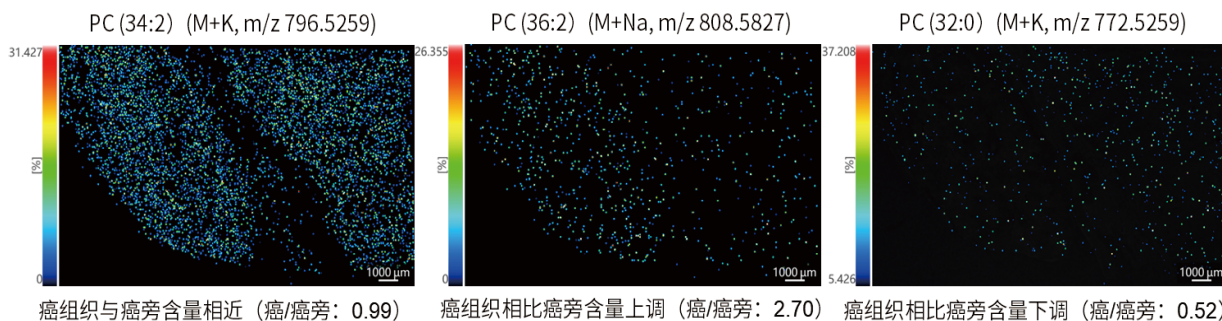


图 5 磷脂酰胆碱 (PC) 在肝癌组织和癌旁组织中的空间分布图示例

表 3 各类脂质成分分析结果示例

Label	m/z	Adduct Ion	癌组织 intensity	癌旁 intensity	癌 / 癌旁 ratio
PC(34:2)	796.5259	M+K	16864.27	17017.29	0.99
PC(44:4)	894.6946	M+H	1417.80	385.44	3.68
PC(42:1)	894.6922	M+Na	1277.90	367.16	3.48
PC(38:5)	808.5851	M+H	2405.21	882.63	2.73
PC(36:2)	808.5827	M+Na	2381.51	881.51	2.70
PC(32:0)	772.5259	M+K	1462.18	2792.45	0.52
PC(30:0)	744.4946	M+K	516.70	850.40	0.61
PG(34:1)	749.5327	M+H	910.52	387.28	2.35
PG(38:5)	797.5327	M+H	7709.62	6891.71	1.12
PG(36:2)	797.5303	M+Na	7607.54	6702.55	1.14
DG(34:2)	631.4704	M+K	3226.54	595.02	5.42
DG(36:3)	657.486	M+K	3122.64	332.12	9.40
DG(34:1)	633.486	M+K	3053.23	503.24	6.07
DG(40:2)	677.6079	M+H	73.78	200.17	0.37
FFA(16:0)	279.2295	M+Na	261.89	23.36	11.21
FFA(22:1)	377.2822	M+K	460.63	62.35	7.39
FFA(18:1)	321.2196	M+K	165.94	45.29	3.66
FFA(18:0)	323.2352	M+K	60.16	105.52	0.57
AC(24:1)	454.3891	M+H	50.05	4.99	10.03
AC(25:3)	502.3299	M+K	10721.89	3612.46	2.97
AC(28:1)	532.4336	M+Na	107.61	40.48	2.66
AC(21:0)	436.3397	M+Na	48.50	21.62	2.24
AC(23:0)	442.3891	M+H	23.00	36.99	0.62
PE(42:4)	862.5728	M+K	529.78	249.02	2.13
PE(40:2)	800.6164	M+H	1442.05	793.73	1.82
PE(34:0)	720.5538	M+H	286.89	526.44	0.54
PI(40:3)	939.5933	M+Na	425.99	240.93	1.77
PI(34:1)	837.5488	M+H	200.53	335.49	0.60

磷脂酰甘油 (PG) 变化不如磷脂酰胆碱显著, 只有 PG (34:1) 显著上调 (大于 2 倍), 其他 PG 成分变化基本在 2 倍以内。磷脂酰甘油中表达含量较丰富的成分为 PG (38:5)、PG (36:2)。

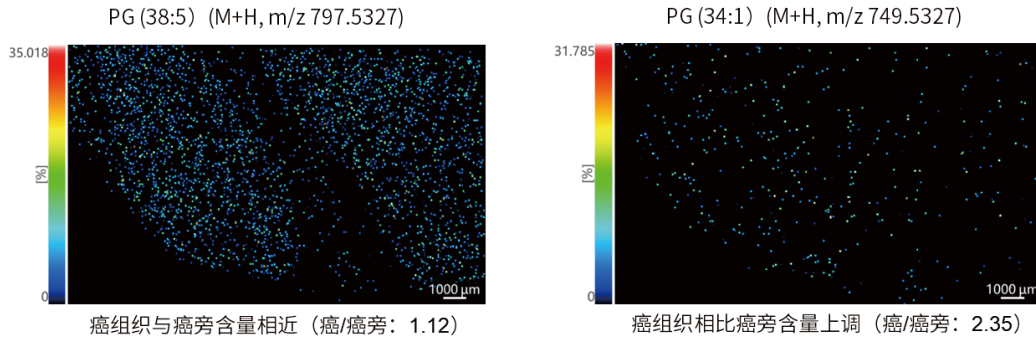


图 6 磷脂酰甘油 (PG) 在肝癌组织和癌旁组织中的空间分布图示例

癌组织中整体变化最为显著的一类脂质是甘油二酯 (DG), 且以上调为主, 如 DG (34:2)、DG (36:3)、DG (34:1) 等在癌组织中的含量显著上调 (大于 5 倍), DG (40:2) 在癌组织中含量下调。

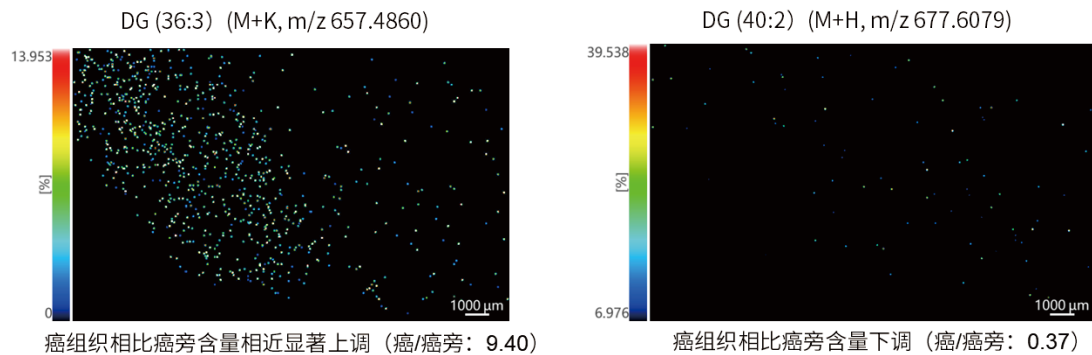


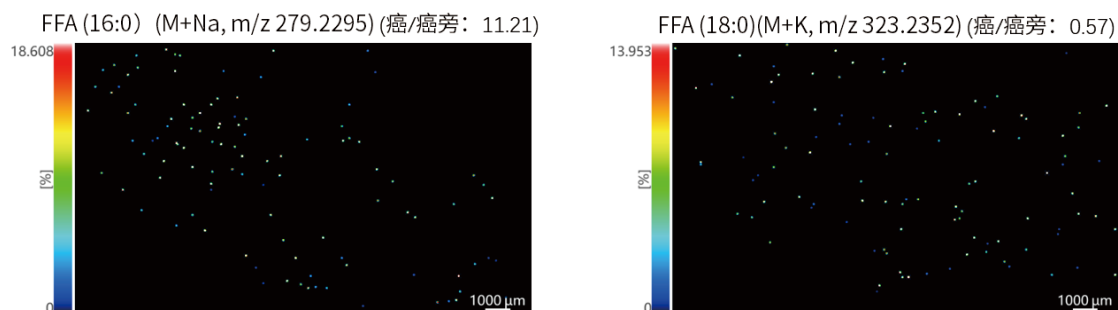
图 7 甘油二酯 (DG) 在肝癌组织和癌旁组织中的空间分布图示例

游离脂肪酸 (FFA) 的整体含量相对较低, 是除甘油二酯外变化较为显著的另外一类脂质, 其中 FFA (16:0)、FFA (18:1)、FFA (22:1) 等在癌组织中的含量相对癌旁区域显著上调, FFA (18:0) 含量下调 (图 8)。

酯酰肉碱 (AC) 中 AC (28:1)、AC (24:1)、AC (21:0) 等在癌组织中的含量相对癌旁区域上调, AC (23:0) 含量下调 (图 8)。

磷脂酰乙醇胺 (PE) 在癌组织中的分布情况整体相似, 变化不显著, PE (40:2)、PE (42:4) 等在癌组织中的含量相对癌旁区域略微上调, PE (34:0) 含量略微下调 (图 8)。

磷脂酰肌醇 (PI) 在癌组织及癌旁区域内的含量相似, 癌组织中变化不显著, 上调倍数与下调倍数最大的分别为 PI (40:3) 与 PI (34:1), 化合物的变化倍数均在 2 倍以内。



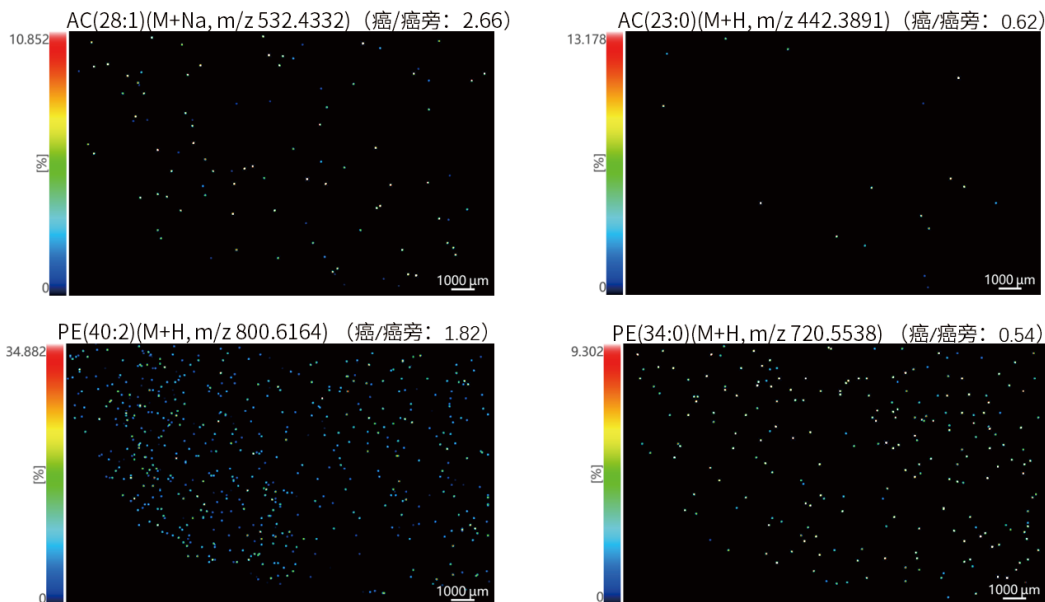


图8 游离脂肪酸 (FFA)、脂酰肉碱 (AC)、磷脂酰乙醇胺 (PE) 在肝癌组织和癌旁组织中的空间分布示例

癌组织中的脂质整体表达量略高于癌旁，提示癌组织中脂质代谢增强，这可能与癌组织细胞增殖、侵染能力增强有关；据研究报道，脂肪的累积（主要是甘油三酯）与多种癌症的发生有关，而甘油三酯在相关酶的作用下，可水解为甘油二酯、甘油单酯和甘油骨架，同时释放出游离脂肪酸，这与本研究中观察到癌组织中多种甘油二酯 (DG) 及部分游离脂肪酸 (FFA) 表达量上调的趋势一致；甘油磷脂是生物体内含量最为丰富的脂质，是细胞膜的重要组成部分，包括磷脂酰胆碱 (PC)、磷脂酰甘油 (PG)、磷脂酰肌醇 (PI)、磷脂酰乙醇胺 (PE)、磷脂酸 (PA) 等，不同的磷脂分子在酶的作用下可以相互转化。磷脂中的不饱和脂肪酸被认为决定了细胞膜的流动性和变形性。在本研究中发现，PC (44:4)、PC (42:1)、PC (38:5)、PC (36:2)、PC (38:7)、PG (34:1)、PE (40:2)、PE (42:4) 等不饱和磷脂在癌组织中的表达量上调，而 PC (32:0)、PC (30:0)、PE (34:0) 等饱和磷脂表达量下调，表明癌组织中细胞膜的流动性增强，这与癌细胞增殖与侵染能力增强相一致。

■ 结论

本文应用岛津成像质谱显微镜 iMScope QT 对人肝癌及癌旁正常组织进行了原位脂质组分析，观察到癌组织中磷脂酰胆碱、磷脂酰甘油、甘油二酯、游离脂肪酸、脂酰肉碱、磷脂酰乙醇胺、磷脂酰肌醇等七类脂质的变化趋势，筛选出一系列含量变化显著的脂质分子，为肝癌脂质代谢机制研究、肿瘤标志物筛选、靶向治疗提供了参考。本方法无需对样品进行复杂的化合物提取等前处理，减少了脂质的破坏和损失，既可以对组织切片进行形态学显微观察，又能对其中的脂质成分进行定性定量分析，是生物体内脂质组学分析的强有力的研究手段。

岛津应用云

